

PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

V.I. MISTRETTA (1), E. CAVALIER (2), J. COLLETTE (3), J.P. CHAPELLE (4)

RÉSUMÉ : Contrairement à un antisérum polyclonal, un anticorps (Ac) monoclonal est une préparation homogène spécifique d'un unique épitope de la surface d'un antigène complexe. C'est en 1975 que Köhler et Milstein produisent les premiers Ac monoclonaux en utilisant une méthode qui est devenue rapidement l'une des technologies clés de l'immunologie. En fusionnant des lymphocytes B activés avec des cellules de myélome, ils ont été capables de former des cellules hybrides - appelées hybridomes - qui conservent les propriétés sécrétrices d'anticorps des cellules B activées et celles d'immortalité des cellules de myélome. Sélectionnés et clonés, ces hybridomes constituent une source théoriquement illimitée d'anticorps spécifiques, tous identiques. Ces anticorps ont d'abord trouvé de nombreuses applications au niveau de la recherche fondamentale et du diagnostic *in vitro*. Dans le laboratoire de Biologie clinique, les Ac monoclonaux sont utilisés comme réactifs dans les immunodosages, remplaçant souvent les antisérums traditionnels. De nombreuses années de développement et d'innovation ont été nécessaires pour humaniser les Ac monoclonaux, afin de les rendre utilisables en thérapeutique humaine.

MOTS-CLÉS : Anticorps monoclonaux - Anticorps polyclonaux - Production

INTRODUCTION

Grâce à la mise au point de la technologie des hybridomes en 1975, Georges Köhler, immunologiste allemand, et César Milstein, biochimiste britannique d'origine argentine, ont fabriqué pour la première fois des anticorps (Ac) monoclonaux, ce qui leur a valu le prix Nobel Médecine et de Physiologie en 1984 (1). Durant les années qui suivirent leur découverte, les Ac monoclonaux sont devenus des outils révolutionnaires largement exploités en laboratoire, jusqu'à devenir omniprésents dans le domaine de la recherche et du diagnostic médical, comme nous l'avons expliqué de façon détaillée par ailleurs (2). En thérapeutique, si les Ac monoclonaux, dits de «première génération», se sont montrés décevants en raison de leur immunogénicité élevée et de leur demi-vie trop courte, les progrès réalisés par la suite, notamment en biologie moléculaire, ont permis de disposer de molécules beaucoup mieux tolérées. Ainsi, d'autres générations d'Ac se sont succédé : les Ac chimériques, puis les Ac humanisés et, enfin, les Ac totalement humains, ainsi que décrit dans un autre article de ce

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES

SUMMARY : In contrast to a polyclonal antiserum, a monoclonal antibody is specific to a single epitope on the surface of a complex antigen. In 1975, Köhler and Milstein produced the first monoclonal antibodies by using a method which rapidly became a key technology in immunology. By fusing activated antibody-forming cells (B cells) with myeloma cells, they obtained hybrid cells - the so-called hybridomas - which combine the ability of the activated B cells to secrete a single species of antibody and the immortality of the myeloma cell. The selected hybridomas proliferate continuously, their clonal progeny providing an unending supply of antibody with a single specificity. These antibodies have found many applications in basic research and *in vitro* diagnosis. In the clinical laboratory, monoclonal antibodies are used as reagents in immunoassays, often replacing traditional antisera. Many years of development and innovation were needed to humanize monoclonal antibodies in order to make them usable in human therapy.

KEYWORDS : Monoclonal antibodies - Polyclonal antibodies - Production

numéro (3). Les applications de ces nouveaux anticorps sont nombreuses et variées; citons, par exemple, la diminution ou l'arrêt d'une prolifération tumorale, l'inhibition de l'aggrégation plaquettaire, la prévention d'une invasion virale, la neutralisation de toxines, etc. (4). Nous abordons dans cet article les méthodes d'obtention des différentes générations d'Ac monoclonaux, ainsi que la comparaison des Ac monoclonaux avec les antisérums polyclonaux, avec lesquels ils entrent en concurrence dans certaines applications de diagnostic *in vitro*.

PRINCIPE DE LA PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

Dans la technique de base, la production des Ac monoclonaux se déroule en deux étapes principales, à savoir, la production *in vivo* (immunisation) de cellules lymphoïdes sécrétant des Ac, leur hybridation et la sélection *in vitro* d'un hybridome producteur d'Ac, puis la multiplication de clones de l'hybridome, soit *in vitro*, soit *in vivo*, afin d'obtenir de grandes quantités d'Ac (5).

OBTENTION ET SÉLECTION DES HYBRIDOMES

L'antigène contre lequel on veut préparer des Ac est injecté à l'animal avec ou sans adjuvant. Des injections de rappel et des saignées d'es-

(1) Assistante, (2) Chef de Laboratoire, (3) Chercheur qualifié, (4) Chef de Service, Service de Chimie Médicale, CHU de Liège.

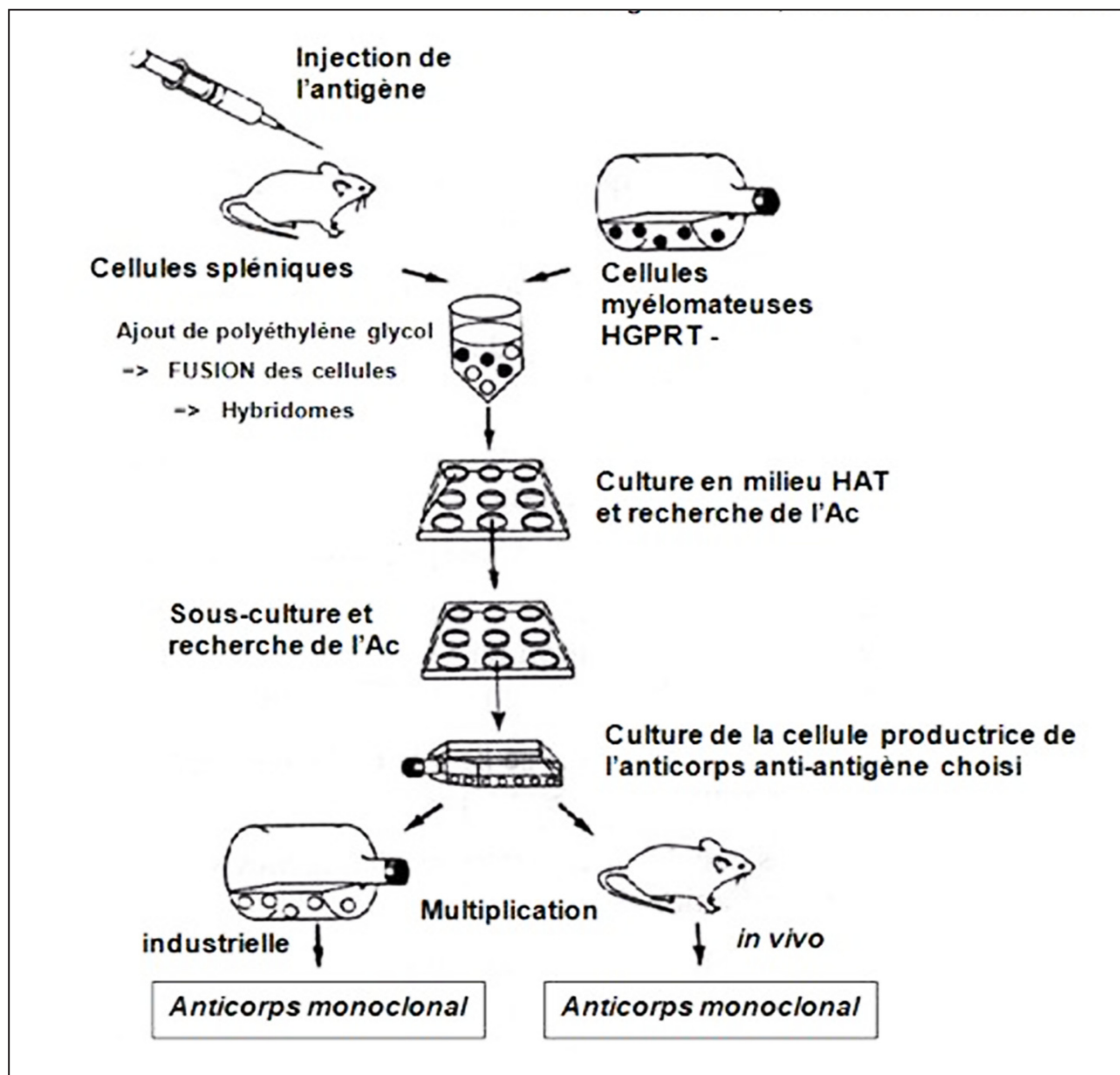


Figure 1. Procédé de production d'Ac monoclonaux spécifiques d'un antigène donné, selon G. Köhler et C. Milstein.

sai sont réalisées, ces dernières visant à vérifier qu'il y a production d'Ac spécifiques dirigés contre l'antigène d'intérêt. Les cellules lymphoïdes de la rate ou des ganglions lymphatiques de l'animal sont isolées (Fig. 1). Elles sont ensuite fusionnées, en présence de polyéthylène glycol, avec des cellules myélomateuses préalablement cultivées et sélectionnées *in vitro* pour leur déficience en hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT-) ou, plus rarement, en thymidine kinase (TK-). Le mélange de toutes ces cellules (hybrides et cellules parentales) est placé sur un milieu de culture sélectif appelé milieu HAT (Hypoxanthine, Aminoptérine et Thymidine) (5, 6).

La sélection par le milieu HAT dépend du fait que les cellules de mammifères peuvent synthéti-

ser les nucléotides par deux voies différentes : la voie *de novo* et la voie de récupération. La voie *de novo*, dans laquelle un groupe méthyle ou formyle est transféré à partir d'une forme activée du tétrahydrofolate, est bloquée par l'aminoptérine, qui est un analogue de l'acide folique. Lorsque la voie *de novo* est bloquée, les cellules utilisent la voie de récupération, qui contourne le blocage par l'aminoptérine en incorporant directement les purines et les pyrimidines dans les nucléotides nécessaires à la synthèse du DNA et du RNA. Les enzymes qui catalysent la voie de récupération incluent HGPRT et TK. Une mutation de l'un ou l'autre de ces deux enzymes bloque la capacité de la cellule à utiliser la voie de récupération et entraîne sa mort dans le milieu HAT (7).

Dans la technologie des hybridomes, les cellules de myélome utilisées sont, en fait, des doubles mutants. Comme mentionné précédemment, elles n'ont pas l'enzyme HGPRT. Elles ont aussi perdu la capacité de produire des immunoglobulines (mutants Ig⁻). En utilisant des mutants Ig⁻, on s'assure que les Ac produits par l'hybridome ne sont codés que par les cellules spléniques et que les cellules de myélome n'apportent que leur propriété d'immortalité aux cellules résultant de la fusion. L'autre partenaire de la fusion est habituellement une population de cellules spléniques contenant des cellules B HGPRT⁺ activées par l'antigène (Ig⁺). Ces cellules contribuent à la capacité des hybridomes à utiliser la voie de récupération de l'hypoxanthine, ce qui rend ainsi possible leur survie dans le milieu HAT. Quant aux lymphocytes B non fusionnés, ils disparaissent au bout de quelques jours, car ils sont incapables de se répliquer *in vitro*. De même, si des hybrides se forment entre cellules B ou entre cellules de myélome, ils disparaissent spontanément (7).

PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

Les hybridomes qui produisent les Ac monoclonaux désirés sont sélectionnés et ensuite clonés. On peut alors multiplier les clones positifs (producteurs de l'Ac d'intérêt) soit en continuant de les cultiver *in vitro*, soit en utilisant l'animal immunisé pour une production *in vivo*.

Lorsqu'un hybridome est cultivé dans des flacons de culture de tissu, l'Ac est sécrété dans le milieu, habituellement à de très faibles concentrations (1-20 µg/mL). Un hybridome introduit par injection dans la cavité péritonéale d'une souris compatible s'y développe et sécrète l'Ac monoclonal dans le liquide d'ascite à des concentrations beaucoup plus élevées (habituellement, 1-10 mg/mL environ). L'Ac peut être ensuite purifié par chromatographie du liquide d'ascite. Pour répondre à la demande croissante d'Ac monoclonaux, des techniques de croissance *in vitro* des cellules d'hybridomes à de très hautes densités ont été développées (7).

Les animaux, souris ou rats, utilisés à la fois pour l'immunisation en vue de la préparation du clone d'hybridome et pour la production subséquente d'Ac monoclonaux (production *in vivo*), doivent être de même souche (syngéniques) pour des raisons d'histocompatibilité. Les souris Balb/c sont le plus souvent utilisées, car, de surcroît, les cellules myélomateuses parentales employées dans le processus de fusion proviennent souvent de ces souris. Une alternative est d'avoir recours aux souris SCID (syndrome

d'immunodéficience sévère combinée) qui, bien que coûteuses, produisent moins d'Ac murins non spécifiques avec un rendement équivalent d'Ac monoclonaux spécifiques, ce qui a pour effet de faciliter la purification de ces derniers (5, 8, 9).

ANTICORPS MONOCLONAUX À USAGE THÉRAPEUTIQUE

Dès 1975, les Ac monoclonaux produits par la technique des hybridomes sont utilisés en thérapeutique et désignés par un nom se terminant par le suffixe «-momab». Cependant, ces anticorps étant d'origine murine, les patients traités par ces médicaments produisaient des anticorps anti-souris (HAMA, Human Anti-Mouse Antibody). De plus, ces anticorps de première génération avaient une demi-vie très courte après injection et n'étaient pas capables d'exercer certaines fonctions effectrices. Ces lacunes ont donc conduit, en 1984, à la production d'une nouvelle génération d'anticorps, les anticorps chimériques, désignés par le suffixe «-ximab» (exemple de spécialité mise sur le marché : Erbitux®, cétuximab). Dans ce cas, les domaines constants de l'anticorps murin sont substitués par les domaines constants humains équivalents. Par conséquent, le caractère immunogène est diminué mais, néanmoins, reste toujours présent (4, 10).

Afin de diminuer leur immunogénicité, des anticorps, dits humanisés, ont été développés entre 1988 et 1991 et désignés par le suffixe «-zumab» (exemple de spécialité mise sur le marché : Avastin®, bévacicumab). Cette troisième génération d'Ac monoclonaux est constituée d'immunoglobulines humaines dont seules les parties hypervariables (CDR, Complementary Determining Regions) sont d'origine murine (2). Cette humanisation implique, en plus de la permutation des régions constantes, la substitution par des équivalents humains des régions charpentes situées au sein des domaines variables. Il s'agit ainsi, le plus souvent, d'une greffe de CDR sur les régions charpentes d'un anticorps humain. La méthode utilisée consiste en une sélection guidée basée sur des techniques de présentation à la surface de bactériophages (10).

Enfin, de 1994 à 1999, une dernière génération d'anticorps a vu le jour, les anticorps totalement humains, portant le suffixe «-mumab» (exemple de spécialité mise sur le marché : Vectibix®, panitumumab). L'obtention d'hybridomes humains étant très délicate, d'autres méthodologies sont utilisées pour créer ces anticorps d'origine

humaine : les souris transgéniques humanisées (les gènes d'anticorps humains sont introduits à la place du matériel génétique immunitaire de la souris) ou les banques combinatoires d'anticorps exprimés à la surface de bactériophages (phage display) (4, 10, 11).

Par ailleurs, dans certaines situations, l'emploi de fragments d'anticorps (Fab - antigen-binding Fragment, scFv - single-chain Fragment variable) s'est avéré plus pertinent (12). En effet, la présence des récepteurs Fc n'est pas toujours requise : c'est le cas, par exemple, lors d'inactivation de cytokines ou de neutralisation virale. De plus, ces fragments étant de plus petite taille que l'anticorps entier, ils peuvent avoir une meilleure biodisponibilité et être plus facilement produits dans des systèmes procaryotes ou des levures (10).

PRODUCTION DES ANTICORPS POLYCLONAUX

Les Ac polyclonaux sont des Ac produits par plusieurs familles de lymphocytes B. Par conséquent, ils reconnaissent plusieurs épitopes, y compris sur le même antigène. Les antisérums contenant ces Ac polyclonaux sont généralement produits par injection, à un animal, de l'immunogène cible (antigène), souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. Cette dernière peut, par la suite, être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. Des échantillons de sang sont prélevés chez l'animal pour évaluer le niveau de production d'Ac. Lorsque le titre est suffisamment élevé, l'antisérum est préparé en effectuant une importante prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des Ac à partir du sérum (5).

Le choix de l'espèce animale utilisée dépend de plusieurs facteurs, dont le volume de sérum requis (qui dépend lui-même de la quantité d'Ac polyclonaux à produire) et le type d'immunoessai. L'âge, le sexe et l'état de santé de l'animal sont également importants (13). Les espèces animales les plus fréquemment utilisées pour la production d'Ac polyclonaux sont le lapin, la souris, le rat, le hamster, le cochon d'Inde, la chèvre, le mouton et le poulet (8). Des espèces animales de grande taille (par exemple, des chevaux) peuvent aussi être utilisées afin d'obtenir des volumes plus importants d'antisérum, mais l'entretien de ces animaux est plus coûteux. Par ailleurs, il est possible d'extraire les immunoglobulines du lait des bovins, des brebis et des chèvres, ce qui représente une

TABLEAU I. COMPARAISON DES PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DES AC POLYCLONAUX ET DES AC MONOCLONAUX

	Ac polyclonaux	Ac monoclonaux
Temps et coût de fabrication	Rapide et moins cher	Lent et plus cher
Compétences techniques requises	Moindre	Supérieure
Standardisation	Variable	Standard
Reproductibilité	Variable	Constante
Spécificité	A plusieurs épitopes	A un seul épitope
Affinité	Variable	Constante
Concentration et degré de pureté	Faible	Elevé
Stabilité vs pH	Plus stable	Moins stable
Nombre d'animaux utilisés	Supérieur	Inférieur
Disponibilité	Limitée	Illimitée

méthode non invasive pour la production de grands volumes d'Ac polyclonaux (5).

AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DES ANTICORPS MONOCLONAUX

Pour un ciblage précis tel que requis dans les applications thérapeutiques, l'utilisation des Ac monoclonaux est incontournable. En ce qui concerne l'utilisation comme réactifs dans le diagnostic *in vitro* (2), les antisérums polyclonaux conservent toujours un intérêt dans certaines techniques de dosage. En effet, les Ac polyclonaux peuvent être obtenus beaucoup plus rapidement, à moindre coût et avec moins de compétences techniques que ce qui est requis pour produire des Ac monoclonaux (Tableau I). Il est possible d'obtenir des Ac polyclonaux en 4 à 8 semaines, tandis que la production d'Ac monoclonaux peut prendre 3 à 6 mois. Néanmoins, cet inconvénient doit être mis en balance avec la disponibilité des Ac monoclonaux une fois les hybridomes immortalisés (9, 13, 14). En outre, la production des Ac monoclonaux nécessite moins d'animaux par rapport à la production des Ac polyclonaux, mais la production des premiers par la méthode d'ascite est génératrice d'inconfort et de douleur chez les animaux (15).

Étant donné la diversité des anticorps sécrétés dans la réponse polyclonale, les antisérums polyclonaux sont difficilement reproductibles. La quantité d'anticorps produits et leur qualité varient d'un animal à l'autre et même chez un animal donné à des moments différents. Par conséquent, la disponibilité des Ac polyclonaux est limitée, et leurs caractéristiques peuvent changer pendant la période de production (5).

De plus, la quantité d'Ac polyclonaux obtenue est limitée par la taille de l'animal et par sa durée de vie (9, 14).

Par contre, les Ac monoclonaux, étant issus d'un même clone, sont spécifiques d'un même épitope pour lequel ils ont une affinité déterminée. Ils sont produits de façon constante au cours du temps et en quantité illimitée (9). En effet, les hybridomes sont conservés pendant des années en culture *in vitro* sans modification de l'Ac qu'ils produisent et, de plus, ces cellules peuvent être congelées (6). Néanmoins, comme l'Ac monoclonal est dirigé spécifiquement contre un seul épitope, il suffit que celui-ci subisse une modification mineure (dénaturation, polymorphisme génétique...) pour que sa capacité de liaison avec l'antigène soit perdue. A l'inverse, puisque les Ac polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même antigène complexe, un changement sur un seul ou sur un petit nombre d'épitopes risque moins d'altérer leurs fonctions (5, 14). Afin d'éviter d'éventuels problèmes dus à la monospécificité des Ac monoclonaux et pour augmenter leur hétérogénéité, on en combine parfois deux ou trois, mais il est souvent difficile, trop cher et trop long d'identifier de multiples Ac monoclonaux à spécificité désirée (13, 14).

Les Ac monoclonaux obtenus *in vivo* (ascite) ou *in vitro* (culture) ont une concentration souvent 10 fois plus élevée que celle des Ac polyclonaux et une pureté beaucoup plus élevée (14).

CONCLUSION

Depuis qu'il a été possible de les produire artificiellement et en quantité suffisante, les Ac monoclonaux ont trouvé d'importantes applications dans le diagnostic *in vitro*. L'intérêt des Ac monoclonaux dans le laboratoire d'analyses biomédicales a fait l'objet d'un article spécifique dans ce même numéro (2). Les Ac monoclonaux ont permis l'élaboration de méthodes de dosage très sophistiquées qui permettent de quantifier de nombreux marqueurs dans les milieux biologiques, avec une spécificité très nettement améliorée par rapport aux antisérums polyclonaux. Ceux-ci restent encore très utilisés dans certaines techniques, en raison, notamment, de leur coût moins élevé. Grâce aux progrès accomplis en biotechnologie et, en particulier, aux techniques de recombinaison génétique, il est désormais possible d'obtenir des Ac monoclonaux modifiés de plus en plus proches des immunoglobulines humaines. Ces Ac, chimériques, humanisés ou humains, présentent un risque

réduit d'induire une réponse immunogène chez l'Homme (3). Ainsi, actuellement, ces nouvelles générations d'Ac monoclonaux recombinants sont devenues des médicaments dont le potentiel clinique considérable touche différents domaines médicaux, en particulier ceux de l'oncologie et des maladies auto-immunes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Scheen AJ, Moutschen M.— Editorial. Les anticorps monoclonaux en thérapeutique. *Rev Med Liège*, 2009, **64**, 233-236.
2. Mistretta V, Cavalier E, Collette J, et al.— Intérêt des anticorps monoclonaux dans le laboratoire d'analyses médicales. *Rev Med Liège*, 2009, **64**, 257-263.
3. Scheen AJ.— Nomenclature internationale des différents types d'anticorps monoclonaux. *Rev Med Liège*, 2009, **64**, 244-247.
4. Prin-Mathieu C, Aguilar P, Béné MC, et al.— Anticorps monoclonaux, anticorps thérapeutiques. *Rev Française des Labo*, 2003, 31-39.
5. Conseil Canadien de Protection des Animaux.— <http://www.ccAcca>. Consultation du 29 janvier 2009.
6. Siberil S, Dutertre CA, Boix C, et al.— Anticorps monoclonaux à usage thérapeutique : un peu d'histoire, beaucoup d'ingénierie, et ... quelques succès cliniques. *Transf Clin Biol*, 2005, **12**, 114-122.
7. Goldsby RA, Kindt TJ et Osborne BA.— Immunologie: Le cours de Janis Kuby. Dunod, Paris, 2003, 104-109.
8. Leenaars M, Hendriksen CF.— Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR J*, 2005, **46**, 269-279.
9. Campbell AM.— Production and purification of antibodies, in Diamandis EP et Christopoulos TK Ed. Immunology. Academic Press, Californie, 1996, 95-115.
10. Laffly E, Sodoyer R.— Anticorps monoclonaux et recombinants, 30 ans déjà ... *J Soc Biol*, 2006, **200**, 325-343.
11. Desgranges C.— Anticorps monoclonaux et thérapeutique. *Pathol Biol*, 2004, **52**, 351-364.
12. Scheen AJ.— Nouvelles avancées dans l'utilisation des anticorps monoclonaux en thérapeutique. *Rev Med Liège*, 2009, **64**, 253-256.
13. Leenaars M, Hendriksen CF.— The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. The report and recommendations of ECVAM Workshop 35. *ATLA*, 1999, **27**, 79-95.
14. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, et al.— Monoclonal versus polyclonal antibodies : Distinguishing characteristics, applications, and information sources. *ILAR J*, 2005, **46**, 258-268.
15. National Institutes of Health.— <http://www.nih.gov> - Consultation du 29 janvier 2009.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Pr. J.P. Chapelle, Service de Chimie Médicale, CHU de Liège, 4000 Liège, Belgique.